


  
**PCT**
  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
   
 Internationales Büro
   
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
   
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|   |   |   |  |   |
|---|---|---|--|---|
| <b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> :</b><br><br><b>A61K 49/00, G01S 15/89</b>   | <b>A1</b>   | <b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/25241</b><br><br><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 23. Dezember 1993 (23.12.93) |  |   |
| <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP93/00991<br/> <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 24. April 1993 (24.04.93)<br/><br/> <b>(30) Prioritätsdaten:</b><br/>           P 42 19 724.4      13. Juni 1992 (13.06.92)      DE<br/><br/> <b>(71) Anmelder:</b> SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstr. 170-178, D-13342 Berlin (DE).<br/><br/> <b>(72) Erfinder:</b> REINHARDT, Michael ; Manteuffelstr. 47, D-1000 Berlin 36 (DE). FRITZSCH, Thomas ; Elisenstr. 2, D-1000 Berlin 41 (DE). HELDMANN, Dieter ; Krefelder Str. 3, D-1000 Berlin 21 (DE). SIEGERT, Joachim ; Menzelstr. 26, D-1000 Berlin 41 (DE).         </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, JP, NO, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br/><br/> <b>Veröffentlicht</b><br/> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> </td> </tr> </table> |   |   | <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP93/00991<br><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 24. April 1993 (24.04.93)<br><br><b>(30) Prioritätsdaten:</b><br>P 42 19 724.4      13. Juni 1992 (13.06.92)      DE<br><br><b>(71) Anmelder:</b> SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstr. 170-178, D-13342 Berlin (DE).<br><br><b>(72) Erfinder:</b> REINHARDT, Michael ; Manteuffelstr. 47, D-1000 Berlin 36 (DE). FRITZSCH, Thomas ; Elisenstr. 2, D-1000 Berlin 41 (DE). HELDMANN, Dieter ; Krefelder Str. 3, D-1000 Berlin 21 (DE). SIEGERT, Joachim ; Menzelstr. 26, D-1000 Berlin 41 (DE). | <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, JP, NO, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Veröffentlicht</b><br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> |
| <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP93/00991<br><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 24. April 1993 (24.04.93)<br><br><b>(30) Prioritätsdaten:</b><br>P 42 19 724.4      13. Juni 1992 (13.06.92)      DE<br><br><b>(71) Anmelder:</b> SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstr. 170-178, D-13342 Berlin (DE).<br><br><b>(72) Erfinder:</b> REINHARDT, Michael ; Manteuffelstr. 47, D-1000 Berlin 36 (DE). FRITZSCH, Thomas ; Elisenstr. 2, D-1000 Berlin 41 (DE). HELDMANN, Dieter ; Krefelder Str. 3, D-1000 Berlin 21 (DE). SIEGERT, Joachim ; Menzelstr. 26, D-1000 Berlin 41 (DE).  | <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> CA, JP, NO, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Veröffentlicht</b><br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> |   |  |   |
| <b>(54) Title:</b> USE OF MICROCAPSULES AS CONTRASTING AGENTS IN COLOUR DOPPLER SONOGRAPHY<br><br><b>(54) Bezeichnung:</b> VERWENDUNG VON MIKROKAPSELN ALS KONTRASTMITTEL FÜR DIE FARBDOPPLER-SONOGRAPHIE<br><br><b>(57) Abstract</b><br><br><p>The invention concerns the use of gas-filled or liquid-filled microcapsules as ultrasonic contrasting agents to contrast regions of the body in which substantially no microcapsule movement is observed, the examination being carried out using colour Doppler sonography.</p><br><b>(57) Zusammenfassung</b><br><br><p>Die Erfindung betrifft die Verwendung von gas- oder flüssigkeitsgefüllten Mikrokapseln als Ultraschallkontrastmittel zur Kontrastierung von Körperregionen in denen im wesentlichen keine Bewegung der Mikrokapseln zu beobachten ist, wobei die Untersuchung mit der Farbdoppler-Sonographie durchgeführt wird.</p>  |   |   |  |   |

AL

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                                |    |                                   |    |                                |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Österreich                     | FR | Frankreich                        | MR | Mauritanien                    |
| AU | Australien                     | GA | Gabon                             | MW | Malawi                         |
| BB | Barbados                       | GB | Vereinigtes Königreich            | NL | Niederlande                    |
| BE | Belgien                        | GN | Guinea                            | NO | Norwegen                       |
| BF | Burkina Faso                   | GR | Griechenland                      | NZ | Neuseeland                     |
| BG | Bulgarien                      | HU | Ungarn                            | PL | Polen                          |
| BJ | Benin                          | IE | Irland                            | PT | Portugal                       |
| BR | Brasilien                      | IT | Italien                           | RO | Rumänien                       |
| CA | Kanada                         | JP | Japan                             | RU | Russische Föderation           |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SD | Sudan                          |
| CG | Kongo                          | KR | Republik Korea                    | SE | Schweden                       |
| CH | Schweiz                        | KZ | Kasachstan                        | SK | Slowakische Republik           |
| CI | Côte d'Ivoire                  | LI | Liechtenstein                     | SN | Senegal                        |
| CM | Kamerun                        | LK | Sri Lanka                         | SU | Sowjet Union                   |
| CS | Tschechoslowakei               | LU | Luxemburg                         | TD | Tschad                         |
| CZ | Tschechische Republik          | MC | Monaco                            | TC | Togo                           |
| DE | Deutschland                    | MG | Madagaskar                        | UA | Ukraine                        |
| DK | Dänemark                       | ML | Mali                              | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| ES | Spanien                        | MN | Mongolei                          | VN | Vietnam                        |
| FI | Finnland                       |    |                                   |    |                                |

## Verwendung von Mikrokapseln als Kontrastmittel für die Farbdoppler-Sonographie

Die Patentanmeldung betrifft den in den Patentansprüchen gekennzeichneten Gegenstand, d.h. die Verwendung von Mikrokapseln zur Kontrastierung des retikuloendothelialen Systems, des Myocards und/oder des Gastrointestinaltrakts und anderen Körperhöhlen mittels der Farbdoppler-Sonographie.

Im Bereich der Ultraschall-Diagnostik werden je nach diagnostischer Fragestellung verschiedene Aufnahmetechniken, wie z. B. die M-Mode-, B-Mode-, CW-Doppler-, PW-Doppler- sowie die Farbdoppler-Technik verwendet. M- und B-Mode-Techniken basieren auf dem Prinzip, daß Ultraschallwellen im Megahertz-Bereich (oberhalb 2 Mega-Hertz mit Wellenlängen zwischen 1 und 0,2 nm) an Grenzflächen von Medien mit unterschiedlicher akustischer Dichte reflektiert werden. Die dadurch entstehenden Echos werden verstärkt und sichtbar gemacht. Die Methode ist prinzipiell zur Darstellung verschiedener Organe aber auch zur Abbildung sich bewegender Strukturen, wie z.B. Herzklappen, geeignet.

Im Gegensatz dazu werden die Dopplertechniken ausschließlich zur Untersuchung sich bewegender Strukturen, z. B. zur Quantifizierung der Geschwindigkeit von Blutflüssen, verwendet. So basiert das Messprinzip dieser Techniken darauf, daß das im Ultraschallfeld an bewegten Körpern (z. B. rote Blutzellen) reflektierte Signal einen Frequenzshift (den sogenannten Doppler-Shift) erfährt. Dieser Frequenzshift wird bei der Farbdopplersonographie in Farbsignale umgewandelt, so daß bewegte Strukturen farbig codiert, starre Strukturen jedoch als Grauwert abgebildet werden [R. Omoto (1987) Real-time two-dimensional Doppler echocardiography, 2nd edn. Lea & Febiger, Philadelphia].

Sowohl den Doppler-Techniken als auch den anderen bekannten Techniken wie z.B. B- und M-Mode ist gemein, daß die Kontrastierung und damit die diagnostische Aussage verbessert wird, wenn feine Gasbläschen an den Untersuchungsort gebracht werden (siehe Gramiak, Invest. Radiol 3 (1968) 356/366).

Diese Gasbläschen können auf die verschiedenste Art und Weise hergestellt werden; z.B. durch Schütteln oder andere Agitation von physiologisch verträglichen Lösungen (EP 0 077 752; Roelandt, J. Ultrasound. Med. Biol. 8: 471-492, 1982).

ERSATZBLATT

In der EP 0 052 575 werden Gasbläschen erzeugt, indem eine feste kristalline Substanz, wie beispielsweise Galaktose, in einer Trägerflüssigkeit suspendiert wird. Die Gasbläschen entstehen dabei aus in Hohlräumen eingeschlossenem, bzw. aus an der Kristalloberfläche adsorbiertem Gas.

Die EP 0 122 624 beschreibt ein ähnliches Kontrastmittel auf der Basis einer nicht grenzflächenaktiven Substanz wie z. B. Galaktose, der eine grenzflächenaktive Substanz wie z.B. Magnesiumstearat beigemischt wird, was zu einer Stabilisierung der Gasbläschen führt. Damit wurde auch die Kontrastierung der linken Herzseite, sowie verschiedener Organe wie Leber, Milz und Niere im 2D-Echo-Bild oder im M-Mode-Echo-Bild möglich.

Die DE 38 03 972 offenbart gas- bzw. flüssigkeitsgefüllte Mikrokapseln auf der Basis von bioabbaubaren Polymeren wie z.B. Polycyanacrylaten oder  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Hydroxycarbonsäuren.

Ähnliche Mikrokapseln werden in der Europäischen Patentanmeldung EP 0 441 468 beschrieben. Im Gegensatz zu den in der DE 38 03 972 offenbarten Partikeln ist die Partikelhülle in diesem Falle aus Polyaldehyden aufgebaut.

Die EP 0 224 934 und die US 4,276,885 beschreiben gasgefüllte Mikrokapseln auf der Basis von Proteinen bzw. Albuminen (EP) bzw. auf der Basis von Gelatine (US).

Den Partikeln der DE 38 03 972 und der EP 0 441 468 ist gemein, daß sie ausreichend stabil und genügend klein ( $<10\mu\text{m}$ ) sind, um kapillargängig zu sein und intrazellulär im Retikulo-endothelialen System (wie z. B. Leber, Lymphknoten und Milz) aufgenommen zu werden. Jedoch ist die Kontrastierung bei Verwendung der B-Mode bzw. M-Mode-Technik nicht in allen Fällen zufriedenstellend, z.B. ist Abgrenzung von gesundem Gewebe (z. B. Leber, Milz, Lymphknoten) gegenüber Tumorgewebe, das nur wenige zum retikuloendothelialen System gehörenden Zellen enthält oft nicht möglich.

Daneben bereitet die Darstellung des Gastrointestinaltrakts sowie der Perfusion des Myocards Schwierigkeiten.

Aufgabe der Erfindung ist es, die Kontrastierung der genannten Bereiche zu verbessern.

Es wurde nun festgestellt, daß bei Verabreichung bestimmter Ultraschall-Kontrastmittel überraschend auch in Körperzonen, in denen keine Partikelbewegung stattfindet, das heißt im RES (Leber, Milz und Lymphknoten), im Gastrointestinaltrakt, sowie im Myocard, entgegen der theoretischen Voraussage auch bei Anwendung der herkömmlichen Farbdoppler-Sonographie eine Kontrastierung zu erreichen ist.

Unter "keiner Partikelbewegung" werden Bewegungsgeschwindigkeiten verstanden, die Null bzw. deutlich geringer sind als die bei Perfusion der Blutgefäße auftretenden Strömungsgeschwindigkeiten. Solche Geschwindigkeiten werden als nicht ausreichend für eine Erzeugung eines Farbdoppler-Signals angesehen.

Somit bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung von aus Mikrokapseln bestehenden Kontrastmitteln zur Kontrastierung von Körperregionen, in denen keine Bewegung der Mikrokapseln zu verzeichnen ist, wobei die Aufnahme dennoch mit der Farbdoppler-Technik erfolgt.

Es war weiterhin überraschend, daß die so erzielte Kontrastierung besser ist, als die mit den konventionellen Methoden (B-Mode, M-Mode) erreichbare. Dieses führt zu einer deutlichen Verbesserung des diagnostischen Aussagewertes.

So werden z. B. bei der Untersuchung von Lebergewebe mittels der Farbdoppler-Sonographie, nach intravenöser Injektion des Kontrastmittels, Tumoreale (die bekanntermaßen keine oder nur wenige zur Aufnahme der Partikel befähigten Zellen enthalten) in den gewohnten Grauwerten abgebildet, gesundes Gewebe hingegen überraschenderweise farbig (siehe Abb. 1/rechte Bildhälfte).

Ein Vergleichsphoto im B-Mode, das unter sonst identischen Bedingungen aufgenommen wurde, (siehe Abb. 1/linke Bildhälfte) bestätigt den deutlich verbesserten diagnostischen Aussagewert der Farbdoppler Aufnahme. Tumorbezirke sind nicht mehr von den gesunden Bereichen abzugrenzen.

Nach oraler Applikation ist eine Markierung des Magen-Kanals möglich, die z.B. eine Abgrenzung intestinaler Strukturen von anderen abdominellen Organen ermöglicht.

ERSATZBLATT

Die Darstellung des Gelenkspaltes gelingt nach Verabreichung des Kontrastmittels und unter Nutzung der Dopplertechniken ebenso wie die Abbildung der Tuben und des Cavum Uteri.

Geeignete Mikro kapseln bestehen in der Regel aus einer dünnwandigen Hülle, z. B. einem synthetischen bioabbaubaren polymeren Material und einem Kern, der aus einem Gas oder einer niedrig siedenden Flüssigkeit besteht.

Als geeignete Gase kommen z. B. Luft, Stickstoff, Sauerstoff, gasförmige Kohlenwasserstoffe, Edelgase und Kohlendioxid in Frage. Als niedrig siedende Flüssigkeiten eignen sich 1,1-Dichlorethylen, 2-Methyl-2-buten, 2-Methyl-1,3-Butadien, 2-Butin, 2-Methyl-1-Buten, Dibrom-difluormethan, Furan, 3-Methyl-1-Buten, Isopentan, Diethylether, 3,3-Dimethyl-1-Butin, Propylenoxid, Bromethan, Pentan, Cyclopentan, 2,3-Pentadien, Cyclopentan und deren Gemische.

Als Hüllmaterial eignet sich z. B. bioabbaubares synthetisches Material wie z. B. Polyaldehyde, die gewünschtenfalls zur Copolymerisation fähige Zusätze und/oder Crosslinker, gegebenenfalls Tenside oder Tensidgemische, Kopplungsagentien sowie gegebenenfalls über diese Kopplungsagenzien gebundene Bio- oder Makromoleküle enthalten, Polycyanacrylat oder Polyester von  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Hydroxycarbonsäuren.

Geeignete Hüllmaterialien für gasgefüllte Mikro kapseln sind Gelatine oder Proteine wie z. B. teilweise denaturiertes Albumin oder humanes Serumalbumin.

Die Form der Partikel kann beliebig geartet sein (z. B. sphärisch, ellipsoid usw.), die Wandstärke der Partikel ist vorteilhafterweise so dünn wie möglich zu wählen, vorzugsweise  $<200$  nm.

Die Partikelgröße ist durch die jeweilige Anwendung limitiert, bei Untersuchungen des RES sowie des Myocards sollte sie zwischen 1 bis  $10\text{ }\mu\text{m}$  liegen, um Kapillargängigkeit zu gewährleisten, bei Untersuchungen von Körperhöhlen sowie des Gastrointestinaltrakts sind auch Partikel bis zu einer Größe von  $100\text{ }\mu\text{m}$  geeignet.

Derartig erfindungsgemäß zu verwendende Mittel werden in den Patentschriften DE 38 03 972, in der Europäischen Patentanmeldung 0 441 468, im Europäischen Patent 0 224 934 sowie in der US-Patentschrift 4,276,885 beschrieben.

Erfindungsgemäß bevorzugt sind gasgefüllte Mikrokapseln auf der Basis von Polycyanacrylaten.

Ein neues bevorzugtes Herstellungsverfahren dieser Partikel besteht darin, daß monomeres Cyanacrylat in einer sauren, mit einem Gas oder Gasgemischen gesättigten, wässrigen Lösung, die gegebenenfalls mindestens eine oberflächenaktive Substanz enthält, mit einem Rotor-Stator-Mischer dispergiert wird, die nach 5 Minuten bis 3 Stunden Dispergierung erhaltenen Partikel abgetrennt werden, gegebenenfalls mit Wasser gewaschen werden, anschließend in einem pharmazeutisch akzeptablen Suspensionsmedium aufgenommen und gefriergetrocknet werden, wobei die Suspension vorteilhafterweise während des Einfrierens kräftig bewegt wird. Vorzugsweise wird als Cyanacrylat der Butylester, als Gas Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Edelgase oder Kohlendioxid eingesetzt. Anstelle des Rotor-Stator-Mischers können auch vergleichbare Geräte (wie z.B. ein Dissolver-Rührer) verwendet werden, die ein kräftiges Dispergieren der Mischung erlauben. Als oberflächenaktive Substanz wird (werden) bevorzugt (eine) Substanz(en) aus der Gruppe Polysorbate, Octyl- oder Nonylphenole, Macrogol-glycerolester oder Cetomacrogole oder Poloxamere<sup>®</sup> oder deren Gemische, verwendet. Der pH-Wert der wässrigen gasgesättigten Lösung liegt vorzugsweise zwischen 1,8 und 4,5, zur Einstellung des pH-Wertes eignen sich insbesondere Salz- und Phosphorsäure. Die Abtrennung der Partikel erfolgt mittels Zentrifugation oder Flotation. Als Suspensionsmedium eignet sich Wasser für Injektionszwecke gegebenenfalls mit einem Zusatz von Kochsalz und/oder Glucose und/oder Mannitol und/oder Lactose, das gegebenenfalls zusätzlich noch eine oberflächenaktive Substanz, wie z.B. aus der Gruppe der Polysorbate, Octyl- oder Nonylphenole, Macrogol-glycerolester oder Cetomacrogole oder Substanzen aus der Gruppe der Poloxamere<sup>®</sup> oder deren Gemische und/oder einen mehrwertigen Alkohol enthält.

Ein neues bevorzugtes Herstellungsverfahren von Partikeln auf der Basis von Polyestern besteht darin, daß ein Polyester einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Hydroxycarbonsäure, gegebenenfalls gemeinsam mit einem wasser-dispergierbaren Emulgator, in einem gesundheitlich unbedenklichen Lösungsmittel gelöst wird und diese Lösung unter Dispergierung mit einem Dissolver Rührer oder einem Schallstab zu einer gashaltigen Flüssigkeit gegeben wird, die sofern der Emulgator nicht bereits gemeinsam mit dem Polyester zugesetzt wurde, einen wasser-dispergierbaren Emulgator enthält, die nach 30

Minuten bis 2 Stunden Dispergierung erhaltenen Partikel abgetrennt werden, gegebenenfalls mit Wasser gewaschen werden, anschließend in einem pharmazeutisch akzeptablen Suspensionsmedium aufgenommen und gefriergetrocknet werden. Erfindungsgemäß bevorzugt sind Polymere der Milchsäure oder der Glycolsäure sowie deren Mischpolymerisate. Als unbedenkliches Lösungsmittel wird vorzugsweise erhitzter Ethylalkohol verwendet. Als gashaltige Flüssigkeit wird vorzugsweise Wasser oder Glycerol 87 % verwendet, die bevorzugten Gase sind Luft, Stickstoff, Sauerstoff, Edelgase oder Kohlendioxid. Als wasserdispergierbarer Emulgator sind Phosphatidycholin oder Sucrose-Palmitat-Stearat 15 sowie deren Gemische zu nennen. Als pharmazeutisch akzeptables Suspensionsmedium eignen sich dieselben Medien wie im Falle der Partikel auf der Basis von Polycyanacrylat.

Zur Erreichung der erforderlichen Konzentration von  $10^5$ - $10^7$  Partikel/cm<sup>3</sup> Target-Organ müssen die folgenden Partikelkonzentrationen verabreicht werden:

$10^8$ - $10^{10}$  Partikel/kg Körpergewicht bei Untersuchungen des Gastrointestinaltrakts,

$10^7$ - $10^9$  Partikel/kg Körpergewicht bei Untersuchungen des Lymphsystems,

$10^7$ - $10^9$  Partikel/kg Körpergewicht bei Untersuchungen des RE-Systems und des Myocards.

Die Konzentration des verabreichten Kontrastmittels kann hierbei im Bereich bis zu  $2 \times 10^{10}$  Partikel/ml liegen.

Unterschiedlich sind auch die Zeiträume, die im Anschluß an die Applikation bis zum Beginn der Untersuchung verstreichen müssen, um das gewünschte Ergebnis zu erzielen. Erfindungsgemäß bevorzugte Zeitintervalle sind:

10 Sekunden bei Untersuchungen des Myocards,

1-60 Minuten p.i. bei Untersuchungen des RE-Systems,

5-10 Minuten p.i. bei Untersuchungen des Lymphsystems,

5-60 Minuten bei Magen-Darm Untersuchungen.

Im Falle von Körperhöhlen und Blasenuntersuchungen kann mit der Untersuchung unmittelbar nach dem Einbringen des Kontrastmittels begonnen werden.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert:

ERSATZBLATT

**Beispiel 1**

0,4 ml Cyanacrylsäurebutylester werden in 60 ml Salzsäure von pH 2,0 die 1 % Poloxamer 407 enthält, mit einem Rotor-Stator-Mischer 5 Minuten lang dispergiert. Die Mikropartikel mit einer durchschnittlichen Größe von  $2\text{ }\mu\text{m}$  werden abzentrifugiert und in 300 ml einer wässrigen Lösung von 1 % Poloxamer und 5 % Glucose aufgenommen. Die Dichtebestimmung ergibt ein spezifisches Gewicht von  $0,2\text{ g/cm}^3$ .

**Beispiel 2**

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei die Salzsäure einen pH-Wert von 2,5 aufweist und Poloxamer 407 durch Octoxynol-9 ersetzt wird. Die Mikropartikel besitzen eine durchschnittliche Größe von etwa  $0,9\text{ }\mu\text{m}$  und ein spezifisches Gewicht von  $0,2\text{ g/cm}^3$ . Sie werden in 300 ml 5 %iger Mannitol-Lösung, die 0,1 % Polysorbat 20 enthält, aufgenommen.

**Beispiel 3**

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei die Salzsäure einen pH-Wert von 3,0 aufweist und Poloxamer 407 durch Cetomacrogol 1200 ersetzt wird. Die Durchschnittsgröße der Mikropartikel beträgt  $1,5\text{ }\mu\text{m}$ , ihr spezifisches Gewicht  $0,3\text{ g/cm}^3$ . Sie werden in 300 ml 5 %iger Mannitol-Lösung, die 0,1 % Cetomacrogol 1200 und 5 % Povidone enthält, aufgenommen.

**Beispiel 4**

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei Poloxamer 407 durch 5 % Polysorbat 40 ersetzt wird. Die Durchschnittsgröße der Mikropartikel beträgt  $1,0\text{ }\mu\text{m}$ , ihr spezifisches Gewicht  $0,4\text{ g/cm}^3$ . Sie werden in 300 ml 5 %iger Mannitol-Lösung, die 1 % Macrogolglycerolhydroxystearat enthält, aufgenommen.

**Beispiel 5**

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei Poloxamer 407 durch 5 % Macrogolglycerolhydroxystearat ersetzt wird. Die Partikel sind durchschnittlich  $0,9\text{ }\mu\text{m}$

groß und haben ein spezifisches Gewicht von  $0,3 \text{ g/cm}^3$ . Sie werden in 300 ml 5 %iger Mannitol-Lösung, die 1 % Macrogolglycerolhydroxystearat und 10 % Propylenglykol enthält, aufgenommen.

#### Beispiel 6

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei Cyanacrylsäurebutylester durch Cyanacrylsäureethylester ersetzt wird. Die Mikropartikel haben eine durchschnittliche Größe von  $1,5 \mu\text{m}$  und ein spezifisches Gewicht von  $0,2/\text{cm}^3$ . Sie werden in 300 ml einer wässrigen Lösung von 1 % Poloxamer 407 und 5 % Glucose aufgenommen.

#### Beispiel 7

Es wird wie in Beispiel 1 verfahren, wobei Cyanacrylsäurebutylester durch Cyanacrylsäureisopropylester ersetzt wird. Die Mikropartikel haben eine durchschnittliche Größe von  $1,3 \mu\text{m}$ , und ein spezifisches Gewicht von  $0,2 \text{ g/cm}^3$ . Sie werden in 300 ml einer wässrigen Lösung von 1 % Poloxamer 407 und 5 % Mannitol und 10 % Propylenglykol aufgenommen.

#### Beispiel 8

3 ml Cyanacrylsäurebutylester werden in 300 ml Salzsäure von pH 2,0, die 1 % Poloxamer 407 enthält, mit einem Dissolver-Mischer 120 Minuten lang dispergiert. Die Mikropartikel mit einer durchschnittlichen Größe von  $2 \mu\text{m}$  und einem spezifischen Gewicht von  $0,1 \text{ g/cm}^3$  werden durch Flotation abgetrennt und in 5 l einer 5 %igen Mannitol-Lösung, die 1 % Poloxamer 407 und 10 % Propylenglykol enthält, aufgenommen.

#### Beispiel 9

Es wird wie in Beispiel 8 verfahren, wobei Poloxamer 407 durch Octoxynol-9 ersetzt und der pH-Wert auf 2,5 eingestellt wird. Die Durchschnittsgröße der Mikropartikel beträgt  $0,8 \mu\text{m}$ , ihr spezifisches Gewicht  $0,15 \text{ g/cm}^3$ . Sie werden in 5 l einer 0,9 %igen Kochsalzlösung, die 0,1 % Cetomacrogol 1200 enthält, aufgenommen.

**Beispiel 10**

Es wird wie in Beispiel 8 verfahren, wobei Poloxamer 407 durch Cetomacrogol 1200 ersetzt wird. Die Durchschnittsgröße der Mikropartikel beträgt  $1,8 \mu\text{m}$ , ihr spezifisches Gewicht  $0,4 \text{ g/cm}^3$ . Sie werden in 5 l einer 5 %igen Glucoselösung, die Cetomacrogol 1200 enthält, aufgenommen.

**Beispiel 11**

Es wird wie in Beispiel 8 verfahren, wobei Poloxamer 407 durch 5 % Polysorbat 60 ersetzt wird. Die Durchschnittsgröße der Mikropartikel beträgt  $1,0 \mu\text{m}$ , ihr spezifisches Gewicht  $0,4 \text{ g/cm}^3$ . Sie werden in 5 l einer 5 %igen Mannit-Lösung, die 1 % Poloxamer 407 und 10 % Propylenglykol enthält, aufgenommen.

**Beispiel 12**

Die in Beispiel 8, 9, 10 oder 11 hergestellten Partikel werden statt in dort angegebenen Lösungen in je 5 l einer 5 %igen Mannitol-Lösung, die 0,1 % Cetomacrogol 1200 und 5 % Povidone enthält, aufgenommen in 15 ml - Portionen unter kräftigem Schütteln eingefroren und gefriergetrocknet. Vor Anwendung wird das Lyophilisat mit Wasser für Injektionszwecke resuspendiert und gegebenenfalls filtriert.

**Beispiel 12a**

Die in Beispiel 8, 9, 10 oder 11 hergestellten Partikel werden statt in dort angegebenen Lösungen in je 5 l einer 10 %igen Lactose-Lösung, die 0,1 % Cetomacrogol 1200 enthält, aufgenommen, in 15 ml - Portionen unter kräftigem Schütteln eingefroren und gefriergetrocknet. Vor der Anwendung wird das Lyophilisat mit Wasser für Injektionszwecke resuspendiert und gegebenenfalls filtriert.

**Beispiel 13**

1,0 g hydriertes Sojalecithin werden in 200 ml Glycerol mit einem Dissolver-Mischer dispergiert. Zu der Dispersion werden nach 60 Minuten 2,0 g in 10 ml siedendem Ethanol gelöstes Poly-L-Lactid (mittleres Molekulargewicht 1100) zugetropft. Es wird

60 Minuten lang weiter dispergiert. Die entstandenen Mikropartikel werden bei 1000 Upm zentrifugiert, der Überstand in 50 ml Wasser aufgenommen, erneut zentrifugiert (1000 Upm), der Überstand wird in 5 %iger Mannitol-Lösung aufgenommen. Diese Suspension wird in 10 ml Portionen aufgeteilt und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird vor Anwendung mit Wasser für Injektionszwecke resuspendiert.

#### Beispiel 14

1,0 g Sucrose-Palmitat-Stearat (HLB 15) werden in 200 ml Glycerol mit einem Dissover-Mischer dispergiert. In die Dispersion wird nach 30 Minuten 1,0 g in 10 ml siedendem Ethanol gelöstes Poly-L-Lactid (mittleres Molekulargewicht 1100) zugetropft. Es wird 60 Minuten weiterdispergiert. Die entstandenen Mikropartikel haben eine durchschnittliche Größe von 2  $\mu\text{m}$ . Sie werden bei 1000 Upm 30 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand wird in 50 ml Wasser aufgenommen, erneut zentrifugiert (1000 Upm), der Überstand wird in 50 ml einer 5 %igen Mannitol-Lösung aufgenommen. Diese Suspension wird in 10 ml-Portionen aufgeteilt und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird vor Anwendung mit Wasser für Injektionszwecke resuspendiert.

#### Beispiel 15

Einem Hund (11 kg Inhalationsnarkose) werden nach Beispiel 8 hergestellte Mikropartikel (250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in einer Dosis von 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht peripher-venös mit einer Geschwindigkeit von 0,1 ml/s injiziert. Nach 10 Minuten stellt sich die Leber bei der Farbdoppleruntersuchung über einen zur Untersuchung ausreichend langen Zeitraum homogen farbcodiert dar.

#### Beispiel 16

Man wiederholt Beispiel 15 mit den in den Beispielen 1 bis 7 oder 9 bis 14 hergestellten Partikeln. Auch hierbei stellt sich die Leber homogen farbcodiert dar.

**Beispiel 17**

Einem Kaninchen (3,5 kg, Inhalationsnarkose) werden nach Beispiel 2 hergestellte Mikropartikel in einer Dosis von 5  $\mu\text{g/kg}$  Körpergewicht peripher - venös injiziert. Nach 10 Minuten stellt sich die Leber bei der Farbdoppleruntersuchung farbcodiert dar, wohingegen Tumorbezirke in den gewohnten Grauwerten erscheinen (siehe Abbildung 1/rechte Bildhälfte). Zum Vergleich wurde auch eine Aufnahme im B-mode unter sonst identischen Bedingungen angefertigt (siehe Abbildung 1/linke Bildhälfte). In dieser Aufnahme ist eine gleichmäßige Verschattung der Leber zu erkennen, eine Abgrenzung der Tumoreale ist nicht mehr möglich.

**Beispiel 18**

4 g Terephthalsäuredichlorid werden in 20 ml Cyclohexan gelöst und in 500 ml 3 %iger Natriumcarbonatlösung, die 1 % Poloxamer 407 enthält, mit einem Propellerrührer emulgiert. Nach Zusatz von 600 mg L-Lysin, in 50 ml 1 %iger Poloxamer 407 - Lösung gelöst, werden die Kapseln mit einer durchschnittlichen Größe von 30  $\mu\text{m}$  abzentrifugiert, in einer zur Injektion geeigneten Flüssigkeit resuspendiert, eingefroren und gefriergetrocknet. Nach Resuspendierung dieser Zubereitung mit Aq. pro inj. liegt eine Suspension gasgefüllter, ca. 30  $\mu\text{m}$  großer Kapseln vor.

**Beispiel 19**

6 g Humanalbumin werden in 30 ml Aqua dest. gelöst und 3 Minuten mit einem Rotor-Stator-Dispergiergerät bei 20.000 Upm behandelt. Unter Weiterrühren werden 150 ml einer 2 % Span<sup>®</sup>85 enthaltenden Lösung von 1 Teil Chloroform und 4 Teilen Cyclohexan zugefügt. Nach 1 Minute werden 2 g Terephthalsäuredichlorid in 20 ml des organischen Lösungsmittels zugesetzt und nur noch mit einem Magnetrührer weitergerührt.

Nach 30 Minuten werden die flottierenden Kapseln abzentrifugiert und anschließend mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen. Es ergibt sich eine Suspension etwa 30  $\mu\text{m}$  großer, gasgefüllter Kapseln.

**ERSATZBLATT**

**Beispiel 20**

200 ml 5 %ige Gelatinelösung von 60 °C und pH 4,5 werden 3 Minuten mit einem Rotor-Stator-Dispergiergerät bei 20.000 Upm behandelt. Unter ständigem Rühren werden 200 ml 5 %ige Gummi-Arabicum-Lösung zugefügt und der Ansatz auf 5 °C abgekühlt. Nach 2 Stunden werden 50 ml 3 %ige Glutaraldehydlösung zugefügt und der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Die flottierenden Kapseln mit einer Größe von 20-50 µm werden abzentrifugiert und mehrmals mit isotoner Kochsalzlösung, die 0,1 % Poloxamer 188 enthält, gewaschen.

**Beispiel 21**

Eine Lösung aus 99,5 g Wasser und 0,5 g Poloxamer 407 wird mit 1 N Salzsäure auf pH 2,4 eingestellt. Zu dieser Lösung wird unter Rühren (4000 Upm) 1,0 g Cyanacrylsäurebutylester gegeben und 60 Minuten lang weitergerührt. Die erhaltene Suspension wird neutralisiert, die gasgefüllten Kapseln mit einer Größe von ca. 30-100 µm werden durch Zentrifugation abgetrennt und in einer zur Applikation geeigneten Flüssigkeit resuspendiert.

**Beispiel 22**

Einem 10 kg schweren narkotisierten Beagle-Hund werden über eine Schlundsonde 30 ml einer Suspension von gasgefüllten Mikropartikeln appliziert, die nach Beispiel 20 hergestellt wurden. Die Konzentration beträgt 1 mg/ml Suspension. Unmittelbar nach Applikation wird der Magen mit einem Farbdoppler-Ultraschallgerät untersucht. Das Lumen stellt sich farbig dar (Abb. 2). 30 Minuten später ist der Dünndarm ebenfalls markiert (Abb. 3).

**Beispiel 23**

Einem in Narkose liegenden Beagle-Hund werden über einen Blasenkatheter in die flüssigkeitsgefüllte Harnblase 3 ml von nach Beispiel 19 hergestellten Mikrokapseln Konz.  $10^9$  Partikel/ml appliziert. In Abb. 4 ist der Effekt vor und nach Kontrastmittelgabe im Farbdopplermode dargestellt.

## PATENTANSPRÜCHE

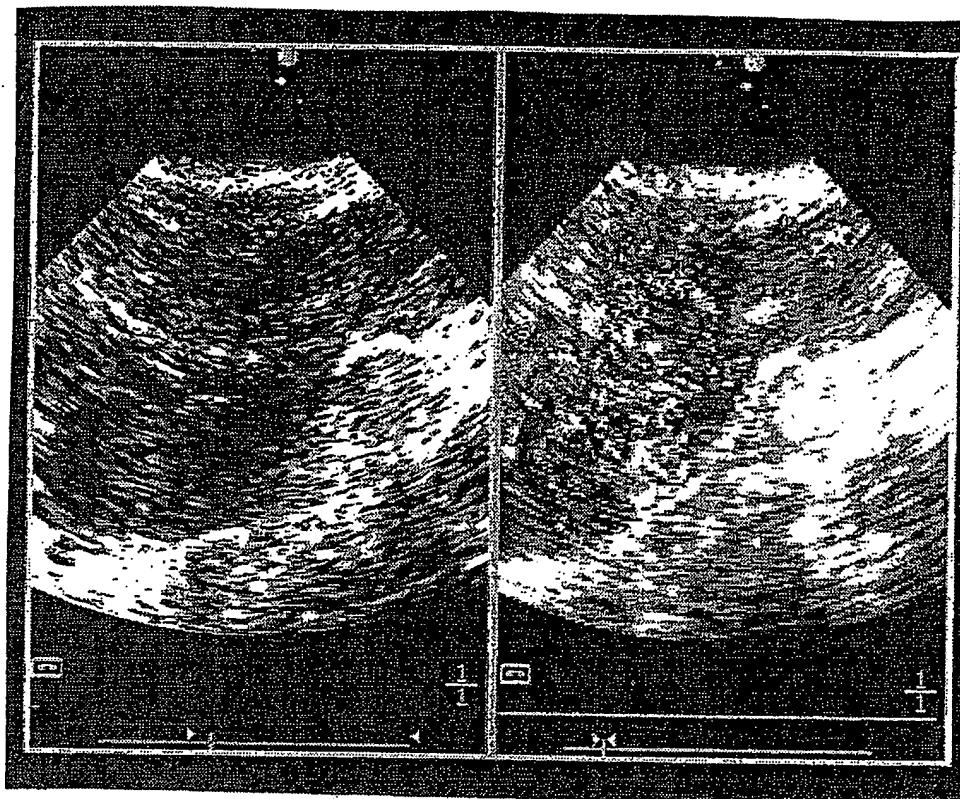
1. Verwendung von gas- oder flüssigkeitsgefüllten Mikrokapseln als Ultraschallkontrastmittel zur Kontrastierung von Körperregionen in denen im wesentlichen keine Bewegung der Mikrokapseln zu beobachten ist, dadurch gekennzeichnet, daß die Untersuchung mit der Farbdoppler-Sonographie durchgeführt wird.
2. Verwendung von Mitteln nach Anspruch 1 enthaltend gas- oder flüssigkeitsgefüllte Mikrokapseln auf Basis von Polycyanacrylaten oder biologisch abbaubaren Polyestern von  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Hydroxycarbonsäuren.
3. Verwendung von Mitteln nach Anspruch 1 enthaltend gas- oder flüssigkeitsgefüllte Mikrokapseln auf der Basis von biologisch abbaubaren Polymeren, die aus polymerisierbaren Aldehyden aufgebaut sind, die gewünschtenfalls zur Copolymerisation fähige Zusätze und/oder Crosslinker, gegebenenfalls Tenside oder Tensidgemische, Kopplungsagentien sowie gegebenenfalls über diese Kopplungsagentien gebundene Bio- oder Makromoleküle enthalten.
4. Verwendung von Mitteln nach Anspruch 1 enthaltend gasgefüllte Mikrokapseln auf der Basis von Gelatine.
5. Verwendung von Mitteln nach Anspruch 1 enthaltend gasgefüllte Mikrokapseln auf der Basis von teilweise denaturierten Proteinen.
6. Verwendung von Mitteln gemäß Anspruch 5 enthaltend als teilweise denaturiertes Protein denaturiertes Albumin oder denaturiertes humanes Serumalbumin.
7. Verwendung von Mitteln gemäß Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die untersuchte Körperregion zum retikuloendothelialen System gehört.
8. Verwendung von Mitteln gemäß Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die untersuchte Körperregion das Myocard ist.

9. Verwendung von Mitteln gemäß Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die untersuchte Körperregion der Gastrointestinaltrakt ist.
10. Verwendung von Mitteln gemäß Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die untersuchte Körperregion das Lymphsystem, die Leber oder die Milz ist.
11. Verwendung von Mitteln gemäß Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Mittel in einer Menge verabreicht wird, die  $10^7$  bis  $10^{10}$  Mikrokapseln pro kg im zu untersuchenden Gewebe ergibt.

Abbildung 1

5 $\mu$ g/kg

TUMOR

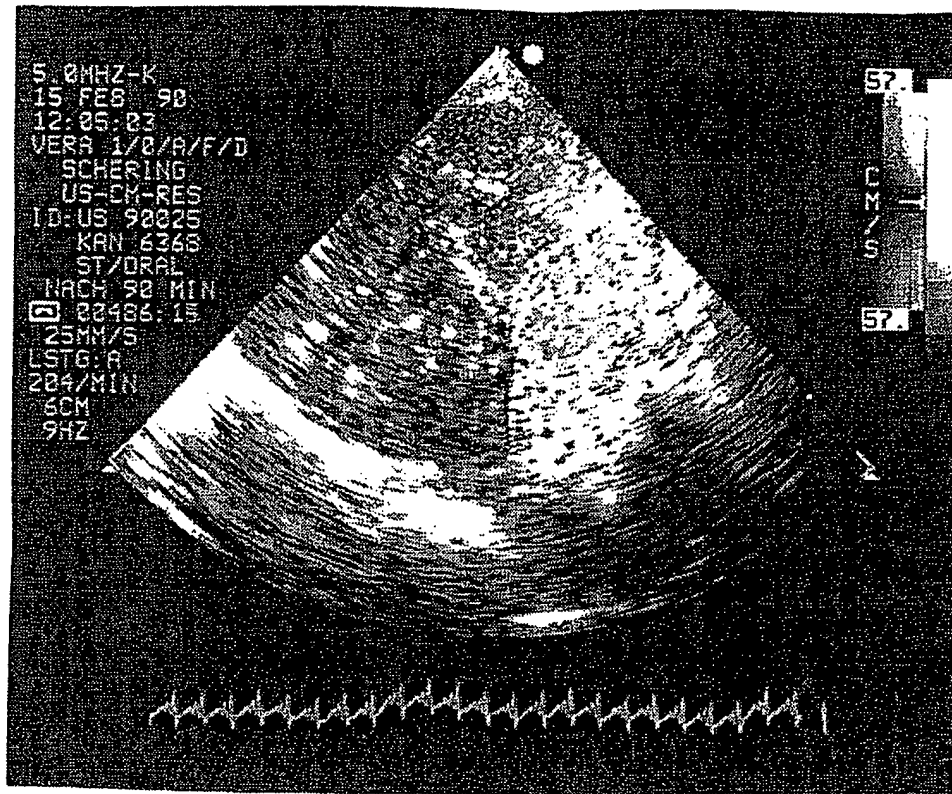


b-mode

FD

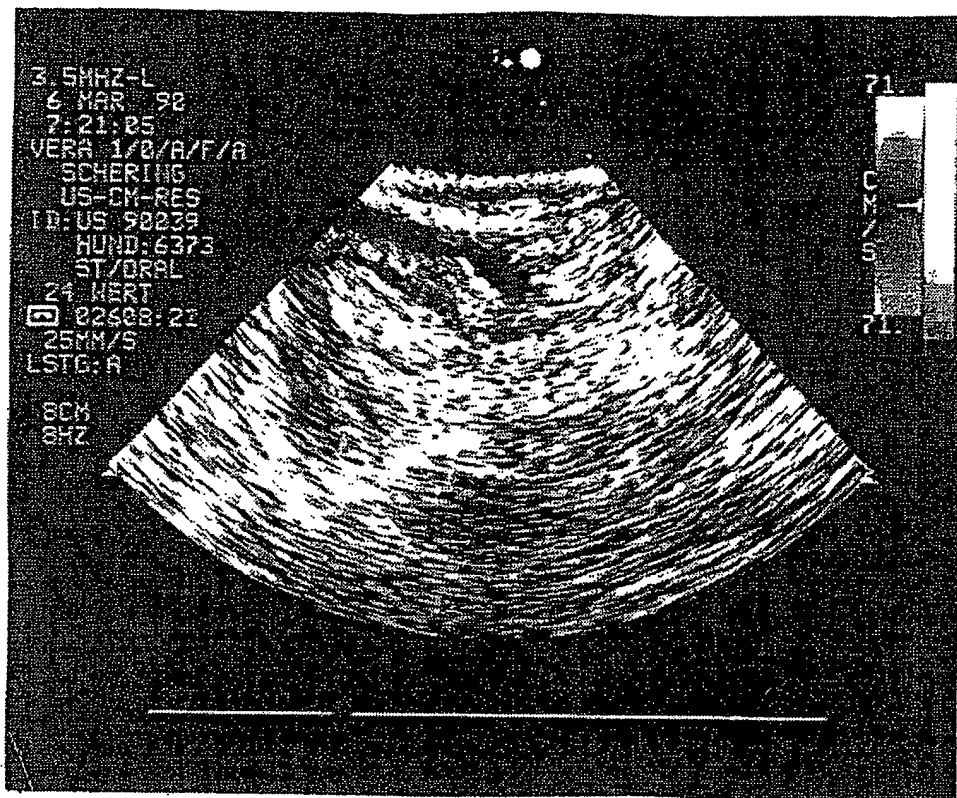
2/4

Abbildung 2



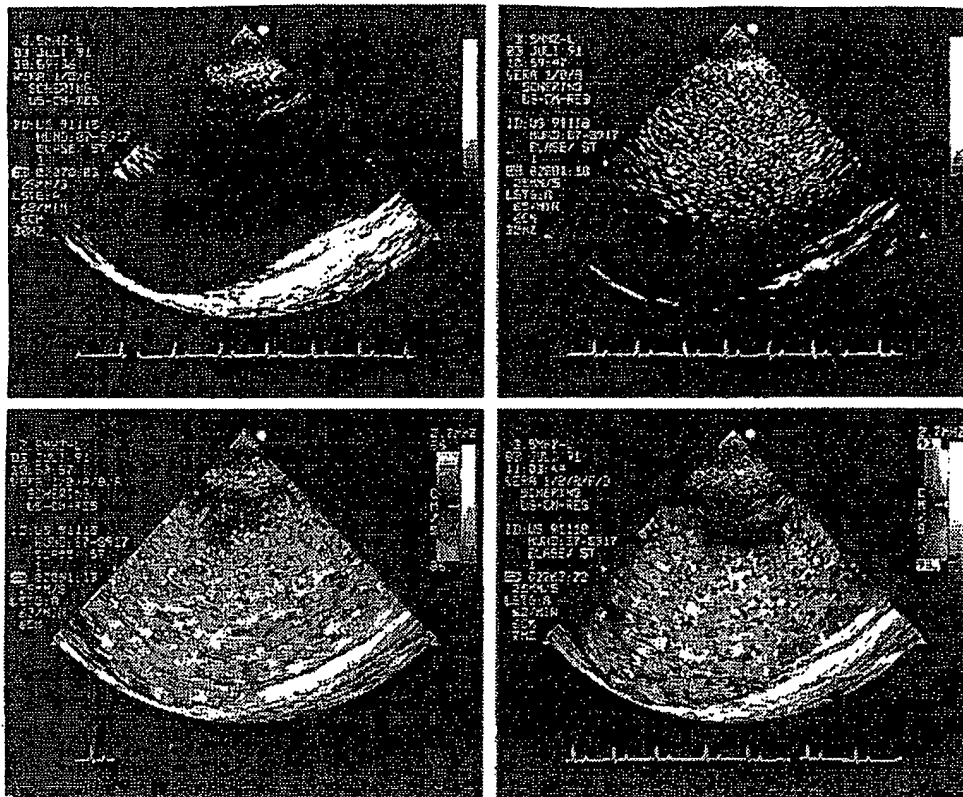
3/4

Abbildung 3



4/4

Abbildung 4



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 93/00991

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>5</sup> A 61 K 49/00; G 01 S 15/89

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>5</sup> A 61 K; G 01 S

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y         | EP, A, 0 327 490 (SCHERING A.G.)<br>9 August 1989<br>cited in the application<br>see column 2, line 24 - line 51;<br>claims 1,3,17,18<br>& DE, A, 3 803 972 | 1-11                  |
| Y         | EP, A, 0 484 181 (FUJITSU LTD.)<br>6 May 1992<br>see claims   | 1-11                  |
|           | -/-   |                       |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 July 1993 (15.07.93)

Date of mailing of the international search report

30 July 1993 (30.07.93)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP 93/00991

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X         | STN FILE SUPPLIER & FILE MEDLINE<br>AN=89333475 (KARLSRUHE)<br>& AM. J. CARDIOL.<br>vol. 64, No. 5, 1 August 1989,<br>pages 374 - 377<br>H. BECHER 'IMPROVED SENSITIVITY OF COLOR<br>DOPPLER BY SH U 454'<br>see the whole document   | 1-11                  |
| P,X       | STN FILE SUPPLIER & FILE MEDLINE<br>AN=9317479<br>& J. AM. COLL. CARDIOL.<br>vol. 21, No. 3, 1 March 1993,<br>pages 737 - 742<br>A. TERASAWA 'ENHANCEMENT OF DOPPLER FLOW<br>SIGNALS IN THE LEFT HEART CHAMBERS BY<br>INTRAVENOUS INJECTION OF SONICATED<br>ALBUMIN.'<br>see the whole document | 1-11                  |
| X         | STN FILE SUPPLIER & FILE MEDLINE<br>AN=91297395   | 1-11                  |
| X         | REV. PRAT.<br>vol. 40, No. 30, 21 December 1990,<br>pages 2779 - 2784<br>MC. MALLERGUE 'COLOR DOPPLER<br>ECHOCARDIOGRAPHY.'<br>see the whole document   | 1,8,11                |
| Y         | WO,A,9 115 999 (THE VICTORIA UNIVERSITY OF<br>MANCHESTER)<br>31 October 1991<br>see page 1, line 17 - line 28<br>see page 5, line 23 - line 34<br>see page 7, line 17 - line 32; claims   | 1-11                  |

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

EP 9300991  
SA 72844

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 15/07/93

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP-A-0327490                              | 09-08-89            | DE-C- 3803971              | 07-09-89            |
|   |                     | DE-A- 3803972              | 10-08-89            |
|   |                     | AU-B- 635200               | 18-03-93            |
|   |                     | AU-A- 3035189              | 25-08-89            |
|   |                     | WO-A- 8906978              | 10-08-89            |
|   |                     | EP-A- 0398935              | 28-11-90            |
|   |                     | JP-T- 3503634              | 15-08-91            |
| EP-A-0484181                              | 06-05-92            | JP-A- 4170943              | 18-06-92            |
|   |                     | US-A- 5215093              | 01-06-93            |
| WO-A-9115999                              | 31-10-91            | AU-A- 7761691              | 11-11-91            |

|   |  |                                  |
|---|--|----------------------------------|
| <b>I. KLASSEFIZIKATION DES ANMELDUNGS-GEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>   |  |                                  |
| Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC<br>Int.Kl. 5 A61K49/00; G01S15/89   |  |                                  |
| <b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>  |  |                                  |
| Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>  |  |                                  |
| Klassifikationssystem   | Klassifikationssymbole   |                                  |
| Int.Kl. 5   | A61K ; G01S  |                                  |
| Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>  |  |                                  |
| <b>III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN</b> <sup>9</sup>  |  |                                  |
| Art. <sup>9</sup>   | Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>   | Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup> |
| Y   | EP,A,0 327 490 (SCHERING A.G.)<br>9. August 1989<br>in der Anmeldung erwähnt<br>siehe Spalte 2, Zeile 24 - Zeile 51;<br>Ansprüche 1,3,17,18<br>& DE,A,3 803 972<br>--- | 1-11                             |
| Y   | EP,A,0 484 181 (FUJITSU LTD.)<br>6. Mai 1992<br>siehe Ansprüche<br>---   | 1-11                             |
|   | ---  | -/--                             |
| <p><sup>10</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"A" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> |  |                                  |
| <b>IV. BESCHEINIGUNG</b>  |  |                                  |
| Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche   | Absenddatum des internationalen Recherchenberichts   |                                  |
| 15. JULI 1993   | 30.07.93   |                                  |
| Internationale Recherchenbehörde  | Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten   |                                  |
| EUROPAISCHES PATENTAMT  | BERTE M.J.   |                                  |

| III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2) |  |                    |
|--|--|--------------------|
| Art °  | Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile  | Betr. Anspruch Nr. |
| X  | STN FILE SUPPLIER & FILE MEDLINE<br>AN=89333475 (KARLSRUHE)<br>& AM. J. CARDIOL.<br>Bd. 64, Nr. 5, 1. August 1989,<br>Seiten 374 - 377<br>H. BECHER 'IMPROVED SENSITIVITY OF COLOR<br>DOPPLER BY SH U 454'<br>siehe das ganze Dokument<br>---  | 1-11               |
| P,X  | STN FILE SUPPLIER & FILE MEDLINE<br>AN=9317479<br>& J. AM. COLL. CARDIOL.<br>Bd. 21, Nr. 3, 1. März 1993,<br>Seiten 737 - 742<br>A. TERASAWA 'ENHANCEMENT OF DOPPLER FLOW<br>SIGNALS IN THE LEFT HEART CHAMBERS BY<br>INTRAVENOUS INJECTION OF SONICATED<br>ALBUMIN.'<br>siehe das ganze Dokument<br>--- | 1-11               |
| X  | STN FILE SUPPLIER & FILE MEDLINE<br>AN=91297395<br>---   | 1-11               |
| X  | REV. PRAT.<br>Bd. 40, Nr. 30, 21. Dezember 1990,<br>Seiten 2779 - 2784<br>MC. MALLERGUE 'COLOR DOPPLER<br>ECHOCARDIOGRAPHY.'<br>siehe das ganze Dokument<br>---  | 1,8,11             |
| Y  | WO,A,9 115 999 (THE VICTORIA UNIVERSITY OF<br>MANCHESTER)<br>31. Oktober 1991<br>siehe Seite 1, Zeile 17 - Zeile 28<br>siehe Seite 5, Zeile 23 - Zeile 34<br>siehe Seite 7, Zeile 17 - Zeile 32;<br>Ansprüche<br>-----   | 1-11               |

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 9300991  
SA 72844

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

15/07/93

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentedokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP-A-0327490  | 09-08-89                      | DE-C- 3803971                     | 07-09-89                      |
|   |                               | DE-A- 3803972                     | 10-08-89                      |
|   |                               | AU-B- 635200                      | 18-03-93                      |
|   |                               | AU-A- 3035189                     | 25-08-89                      |
|   |                               | WO-A- 8906978                     | 10-08-89                      |
|   |                               | EP-A- 0398935                     | 28-11-90                      |
|   |                               | JP-T- 3503634                     | 15-08-91                      |
| EP-A-0484181  | 06-05-92                      | JP-A- 4170943                     | 18-06-92                      |
|   |                               | US-A- 5215093                     | 01-06-93                      |
| WO-A-9115999  | 31-10-91                      | AU-A- 7761691                     | 11-11-91                      |

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82